

3P-199 不飽和モノマーを導入した2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの生合成とその応用

○崔 允圭¹, 松本 謙一郎¹, 田口 精一^{1,2}
 (¹北大院・工・生機高, ²JST・CREST)
 mken@eng.hokudai.ac.jp

(目的) 我々は、酵素進化により基質特異性を拡張したポリヒドロキシアルカン酸重合酵素を用い、世界で初めて乳酸ユニットや 2-hydroxybutyrate (2HB) ユニットを導入したポリマーの生合成に成功した。さらに、様々な官能基をポリマーに導入した新規ポリマーを創出することにより、ポリマーの高機能化が可能だと考えられた。しかし、ポリマー合成系の各酵素の基質特異性により、生合成可能な官能基が制限されるのが問題であった。そこで本研究では、化学反応活性の高い不飽和結合を有する官能基を生合成ポリマー中に導入することを検討した。不飽和結合を有するポリマーを生合成後、さらに化学修飾を行うことにより、高機能化ポリマーの創出を目的とした。
 (方法・結果) 2HB と側鎖に不飽和結合を有する不飽和脂肪酸を LB 培地中に添加し、重合酵素遺伝子とモノマー供給酵素遺伝子を導入した大腸菌を培養後、菌体から合成したポリマーをクロロホルムで抽出し GC/MS および NMR 解析を行った。不飽和脂肪酸に相当するピークが見られることから、不飽和脂肪酸が菌体内に取り込まれ、設計した生合成経路を経てポリマー合成できることを確認した。

The biosynthesis of 2-hydroxybutyrate based polymer with unsaturated side chain

○Yoongyoo CHOI¹, Ken'ichiro MATSUMOTO¹, Seiichi TAGUCHI^{1,2}
 (¹Div. Biotechnol. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²CREST, JST)

Key words polyhydroxyalkanoate, *Escherichia coli*, chiral, evolutionary engineering

3P-201 デンプンを炭素源に用いたポリ乳酸様ポリマーの合成

○門屋 亨介^{1,2}, Song Yuyang¹, 飛谷 康太¹, 松本 謙一郎¹, 田中 勉³, 近藤 昭彦³, 田口 精一^{1,2}
 (¹北大院・総合化学, ²JST・CREST, ³神戸大院・工・応化)
 kadoyar@eng.hokudai.ac.jp

バイオベースプラスチックとして広く用いられているポリ乳酸は、デンプンを出発原料として糖化・乳酸発酵・化学重合のプロセスを経て合成されている。近年我々は、酵素進化工学により創成した乳酸重合酵素遺伝子を組み込んだ組換え大腸菌を用いて他種モノマーと共重合化した多元ポリ乳酸を創製している。一方、食品・医療分野への本格的な展開を考えエンドキシンのコリネ菌でのポリマー生産系を同時に構築しており、デンプンからのワンステップポリマー合成を目指している。すでに、 α -アミラーゼ細胞表面提示株でのデンプンからのポリ 3-ヒドロキシブタン酸の生産の基礎を築いている。そこで、デンプンを直接炭素源として用いた細胞表面提示株でのポリ乳酸様ポリマーのワンステップ生産を検討した。

第一段階として、デンプンの α -アミラーゼ分解物であるマルトースを炭素源としたポリ乳酸様ポリマーの合成を検討した。モノマー供給系酵素、乳酸重合酵素遺伝子を組み込んだ細胞表面提示株を、マルトースを炭素源とする培地で培養した結果、期待通りポリ乳酸様ポリマーの合成が確認できた。以上、過去のグルコースからの生産実績と考え合わせ、 α -アミラーゼによる分解を介してデンプンから効率よくポリ乳酸様ポリマーを合成できることが示唆された。この細胞表面提示株を用いたデンプンを用いたポリ乳酸様ポリマー合成について検討している。

Production of polyesters from starch in *Corynebacterium glutamicum* by using α -amylase cell-surface displaying system

○Ryosuke Kadoya^{1,2}, Yuyang Song¹, kouta Tobitani¹, Ken'ichiro Matsumoto¹, Tsutomu Tanaka³, Akihiko Kondo³, Seiichi Taguchi^{1,2}
 (¹Grad. Sch. Chem. Sci. Eng., Hokkaido Univ., ²CREST, JST, ³Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, cell surface display, polyesters

3P-200 2-ヒドロキシブタン酸ベースポリマーの微生物合成とその物性解析

○三宅 政裕¹, 寺井 彩月¹, 松本 謙一郎^{1,3}, 加部 泰三², 岩田 忠久^{2,3}, 田口 精一^{1,3}
 (¹北大院・工・生機高, ²東大院・農・生物材料, ³JST・CREST)
 mken@eng.hokudai.ac.jp

ポリ乳酸 (PLA) は、最も実用化が進んでいるバイオプラスチックである。当研究室では、微生物内で合成されるバイオプラスチックであるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) の重合酵素を、遺伝子工学的に改変することによって、乳酸 (LA) を取り込み可能な酵素を初めて作製し、その酵素によってポリ (乳酸-co-3-ヒドロキシブタン酸) [P(LA-co-3HB)] の生合成に成功した。P(LA-co-3HB) は PLA に比べ高い柔軟性を示したが、3HB ユニットの二次結晶化により透明度が低下するのが欠点であった。そこで、3HB の代わりに二次結晶化しにくいと予想された 2-ヒドロキシブタン酸 (2HB) ユニットを導入することで、透明性をもちかつ柔軟性が高いポリマーが得られると考えた。LA と 2HB は構造が似ていることから、改良した酵素を用いることで 2HB ベースポリマーの合成が可能であると考えた。

改良型ポリエステル合成酵素およびモノマー供給酵素の遺伝子を導入した組換え大腸菌を、2HB を含む培地で培養し、蓄積されたポリマーをクロロホルムで抽出した。NMR 分析の結果、2HB ユニットに帰属されるシグナルが観測され、P(LA-co-2HB) の合成に初めて成功した。P(LA-co-2HB) をフィルム化し機械的強度を測定した結果、予想通り透明性をもち、PLA に比べ伸びやすく柔軟なポリマーであることが分かった。

Microbial synthesis of 2-hydroxybutyrate-based polyesters and their physical properties

○Masahiro Miyake¹, Satsuki Terai¹, Ken'ichiro Matsumoto^{1,3}, Taizo Kabe², Tadahisa Iwata^{2,3}, Seiichi Taguchi^{1,3}
 (¹Div. Biotechnol. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Dept. Biomater. Sci., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, ³CREST, JST)

Key words poly(lactic acid), LA-polymerizing enzyme

3P-202 *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール生育とポリヒドロキシアルカン酸生合成における金属イオン濃度の影響

○折田 和泉, 中村 聡, 福居 俊昭
 (東工大院・生命理工・生物プロセス)
 tfukui@bio.titech.ac.jp

【目的】メタノール資化性細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 株はメタノールを単一炭素源として生育する際、 C_4 モノマーのみからなるポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) しか蓄積しないとされてきた。しかし我々は培地に添加する微量金属イオンの濃度が本菌のメタノール生育速度に大きな影響を与え、条件によっては C_5 モノマーである 3-ヒドロキシペンタン酸 (3HV) を含む共重合 PHA が生合成されることを見出した。本研究では微量金属イオンの種類や濃度が本菌のメタノール生育能や PHA 共重合組成に与える影響を評価した。
 【方法および結果】0.5%(v/v) メタノールを単一炭素源として培養した菌体をメタノリシス処理し、GC に供することで蓄積 PHA を分析した。培養の結果、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 、あるいは Fe^{3+} の濃度上昇に伴って増殖速度が顕著に増加した。蓄積 PHA 中の 3HV 分率はこれら金属イオンが低濃度のとき高く、増殖速度と強い逆相関を示した。遺伝子破壊実験により、3HV ユニットは本菌のメタノール生育に必須なエチルマロニル-CoA 経路上のプロピオニル-CoA に由来することが強く示唆された。これらの結果から、金属イオン高濃度条件下ではエチルマロニル-CoA 経路のフラックスが増加することでメタノール生育能が向上し、それに伴ってプロピオニル-CoA の細胞内プール量が減少することが推測された。現在、これらの金属イオンがエチルマロニル-CoA 経路を促進する理由を明らかにするための検討を行っている。

The effects of metal ion concentration on methylotrophic growth and PHA biosynthesis properties of *Methylobacterium extorquens* AM1

○Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui
 (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

Key words polyhydroxyalkanoate, methanol, methylotroph, biodegradable plastic